

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-89589

(43) 公開日 平成11年(1999) 4月6日

(51) Int.Cl.<sup>6</sup>

識別記号

F I

C 1 2 P 17/06

C 1 2 P 17/06

A 2 3 J 3/34

A 2 3 J 3/34

A 2 3 L 1/30

A 2 3 L 1/30

B

審査請求 未請求 請求項の数2 O L (全 5 頁)

(21) 出願番号

特願平9-255297

(22) 出願日

平成9年(1997) 9月19日

(71) 出願人 000236768

不二製油株式会社

大阪府大阪市中央区西心斎橋2丁目1番5号

(72) 発明者 荒木 秀雄

大阪府泉佐野市住吉町1番地 不二製油株式会社阪南工場内

(72) 発明者 大和 信也

大阪府泉佐野市住吉町1番地 不二製油株式会社阪南工場内

(72) 発明者 橋本 征雄

大阪府泉佐野市住吉町1番地 不二製油株式会社阪南工場内

(54) 【発明の名称】 大豆胚軸を原料としたイソフラボン化合物を含有する生成物の

製造法

(57) 【要約】

【課題】 イソフラボン化合物の内、配糖体であるダイジン、ゲニスチン等よりも、アグリコン化したダイゼイン、ゲニステイン等の方が癌抑制等の生理作用に、より効果的であると言われている。このアグリコン化したイソフラボン化合物を、従来の技術に無かった方法で、多く含み、かつ、飲食用に利用できる素材の製造法。

【解決手段】 イソフラボン化合物を高濃度に含む大豆胚軸に、微生物由来の酵素を添加して、かつ、従来技術の抽出工程等を必要とせずに、胚軸中の配糖体のイソフラボン化合物をアグリコン化させ、生理作用の優れたアグリコン化したイソフラボン化合物を多く含む素材を得た。これにより、飲食品や医薬用、飼料用にも効果的に利用することが出来て、少なく無い社会貢献も果たせることになる。

BEST AVAILABLE COPY

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】大豆胚軸に微生物由来の酵素を作用させて、その胚軸中のイソフラボン配糖体を分解して、その非配糖体であるアグリコン化したイソフラボン化合物を多く含む生成物を得ることを特徴とする大豆胚軸を原料としたイソフラボン化合物を含有する生成物の製造法。

【請求項2】上記の微生物が、アスペルギルス属である請求項1記載の生成物の製造法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【本発明の属する技術分野】本発明は、大豆胚軸を原料として、微生物由来の酵素を作用させ、大豆由来のイソフラボン、特にそのアグリコン化したイソフラボン化合物を多量に含む生成物の製造法に関する。

## 【0002】

【従来の技術】大豆には、大豆特有のダイジン、ゲニスチン、ダイゼイン、ゲニステイン等のイソフラボン化合物が含まれており、中でも発芽時に幼芽、幼根となる部分である胚軸部に高濃度に含まれている。このイソフラボンは、近年、乳癌、前立腺癌、大腸癌などを抑制すること（Barnesら、Nutr. Cancer、21、113～131、1994）、また疫学的にも大豆製品の摂取量と癌のリスクは逆相関になることが報告されている（渡辺ら、J. Epidemiology、3、47～61、1993）。また、イソフラボン化合物のうち、配糖体であるダイジン、ゲニスチンよりも、アグリコン化したダイゼイン、ゲニステインの方が癌抑制等に、より効果的であるとの指摘がなされている。しかしながら、胚軸中のイソフラボンは大部分が配糖体の形として存在しアグリコンとして存在しているものは約5%以下程度である。そこで、大豆由来の原料からアグリコン化したイソフラボン化合物を得るために、いくつかの方法が試みられている。例えば、大豆中のβ-グルコシダーゼの作用により、アグリコンへの変換する方法（特開平1-258669）、醤油粕または醤油油に生成されたイソフラボンアグリコンから抽出する方法（特開平5-170756）、大豆蛋白に麹菌を作用させてアグリコンを含むイソフラボン化合物を得る方法（特開平8-214787）、植物蛋白質を抽出後、β-グルコシダーゼ又はエステラーゼによってアグリコン化する方法（特表平9-503781）等が知られている。

## 【0003】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、これらの方法ではアグリコンの生成量が低かったり、又は抽出工程が必要で直接食品に利用できなかったり或いは、イソフラボンの含有量の低い原料を使用するたにアグリコンの変換に時間を要したり、もしくは抽出効率が悪い等の問題がある。本発明は、大豆成分中でイソフラボン化合物を最も多く含む大豆胚軸を原料に用い、酵素処理を行うことで、アグリコン化したイソフラボン化合物を多

量に生成させ、抽出等の工程を必要とせずそのまま飲食品、飼料等の用途に利用できる素材を提供するためのものである。

## 【0004】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、大豆胚軸に微生物由来の酵素を作用させて、その胚軸中のイソフラボン配糖体を分解して、その非配糖体であるアグリコン化したイソフラボン化合物を多く含む生成物を得ることを特徴とする大豆胚軸を原料としたイソフラボン化合物を含有する生成物の製造法を見出し、本発明を完成した。即ち、本発明は、大豆胚軸に微生物由来の酵素を添加し反応させることにより、大豆胚軸中にアグリコン化したイソフラボン化合物を多く生成させ、飲食品、飼料等の用途に利用することができる素材を得るものである。以下、本発明を詳述する。

## 【0005】

【発明の実施の形態】本発明で用いる大豆胚軸は、イソフラボン化合物が失なわれていないものであればどのようなものでもよい。種皮の混入がなく、イソフラボン化合物の損失なしに調製するには、乾熱加熱した大豆から分離した胚軸を用いるのがよい。そのような原料胚軸を調製する好ましい方法は、本出願人による特公平04-48417号公報に記載の方法を例示できる。こうして得られた大豆胚軸はそのまま或いは、予め大豆胚軸中に含まれるトリプシンインヒビター等を失活させる為に80～200℃で熱処理をしても良い。加熱処理方法は、通常用いる方法であれば湿式、乾式いずれの方法でも良い。例えば、オートクレーブ処理、オープンロースター処理等が挙げられる。

【0006】本発明に使用する微生物由来の酵素は、培養して得られた粗酵素或いは市販の粗酵素をそのまま使用しても良く、或いは限外ろ過膜、カラム等で濃縮、精製して使用しても良い。添加量は特に限定されないが、大豆胚軸の風味に影響しない程度に添加すれば良い。好ましくは、大豆胚軸100重量部に対して固形分換算で0.1～10重量部添加すれば良い。

【0007】本発明に用いる微生物由来酵素とは、β-グルコシダーゼ活性をもつ微生物であれば、特に限定されないが、好ましくはアスペルギルス属に属する微生物由来のものが良い。例えば、アスペルギルス・アワモリ、アスペルギルス・ジャポニカス、アスペルギルス・カワチ、アスペルギルス・ニガー、アスペルギルス・オリゼ、アスペルギルス・サイトイ、アスペルギルス・ソヤ、アスペルギルス・タマリ、アスペルギルス・ウサミ等が挙げられる。これらの微生物は、プロテアーゼ、ペプチターゼ、リパーゼ、グルコアミラーゼ、アミラーゼ、セルラーゼ、ヘミセルラーゼ、キシラナーゼ、マンナナーゼ、ペクチナーゼ等の酵素を主に産生するがそれ以外にβ-グルコシダーゼも産生する。ここで言うβ-グルコシダーゼとは、大豆イソフラボンの配糖体をアグ

リコン化する酵素である。培養方法は、通常用いられる方法であれば、液体培養、固体培養等いずれの方法でも良い。好ましくは大豆胚軸等のイソフラボン化合物を含むものを培地に添加するのが良い。市販酵素として、 $\beta$ -グルコシダーゼ活性を含むものであれば特に限定されないが、好ましくは上記に記載の微生物由来のものが古くから日本の発酵食品に用いられており、食品として安全で良い。その市販品としては、例えば、アスペルギルス由来の酵素と知られているプロテアーゼA、プロテアーゼM（共に天野製薬社製）、IP酵素、モルシン（共に盛進製薬社製）等のプロテアーゼ、ペプチターゼ、リパーゼA（天野製薬社製）等のリパーゼ、グルクザイム（天野製薬社製）、グルターゼ（阪急共栄物産社製）等のグルコアミラーゼ、ピオザイム（天野製薬社製）等のアミラーゼ、セルラーゼA（天野製薬社製）、セルロシン（阪急共栄物産社製）等のセルラーゼ、ヘミセルラーゼ、キシラナーゼ、マンナーゼ、ペクチナーゼ等が挙げられる。 $\beta$ -グルコシダーゼ活性の有無については大豆胚軸に実際に作用させて作用後のアグリコンの量を液体クロマトグラフィーにて測定すれば容易に定量できる。

【0008】本発明で行う酵素反応としては、微生物由来の酵素を予め水に分散させ、この水に浸漬したり、攪拌・混合させたり、大豆胚軸に直接スプレーしたりする等の方法で大豆胚軸に微生物由来の酵素を接触させて含浸する手段であればいずれの方法も使用できる。加水量としては、特に限定されないが、量が多いと大豆胚軸を乾燥させる際に時間と経費がかかり生産効率が悪く、或いは浸漬水中にイソフラボン化合物が溶出する等の問題がある。好ましくは大豆胚軸100重量部に対して10

～200重量部程度加水するのが良い。

【0009】本発明で行う酵素反応の反応温度は、酵素が急速に失活する温度でなければ特に限定されないが、好ましくは40～60℃であれば良い。その反応時間は雑菌による腐敗が起らない程度の時間であれば特に限定されないが、好ましくは1～24時間が良い。その反応pHは、酵素が失活しないpHであれば特に限定されないが、好ましくはpH4～9が良い。

【0010】以下、本発明の一般的方法について詳述する。

【0011】大豆胚軸をそのまま或いは、酵素が反応しやすいように予め粉砕機等で粉末状或いは粗粉状にしておく。また、トリプシンインヒビター等の酵素反応を阻害するような物質を失活させるために予め80～200℃で10～60分間程度の加熱処理を行っても良い。次に、大豆胚軸に前記の微生物由来の酵素を作用させるが、添加方法は特に限定されない。好ましくは、前もって水に分散させて添加する方が均一に胚軸に含浸されるので良い。大豆胚軸に酵素を混合する方法としては攪拌・混合させたり、大豆胚軸にスプレーしたりする等の大

豆胚軸に酵素を接触させて含浸する手段であればいずれの方法も使用できる。含浸させる場合の時間は3～30分間程度でよい。次に、恒温器で酵素反応を行わせる。その装置は、酵素が安定して作用する温度が保てれば、いずれの装置でも良い。反応終了後は、大豆胚軸を脱水する。脱水は、例えば、ざるで水を切り自然乾燥又は、連続式或いはバッチ式オープンロースター等で加熱乾燥してもよい。これにより、大豆胚軸中に含まれる水分量を10%以下程度に乾燥させると、胚軸の保存安定性もよくなる。こうして得られた大豆胚軸は、飲食品素材としてそのまま利用しても良く、膨化・粉碎等により更に食べやすく加工しても良い。加工は一般的に用いられる方法であれば特に限定されない。この大豆胚軸は、通常よりもアグリコン化したイソフラボン化合物の含有比率が高く、癌抑制等に、より効果のある素材として健康食品、飲料、パン、麺類、菓子類、乳製品、練り製品等の飲食品に利用できる。また、得られた大豆胚軸から水、有機溶剤等によりイソフラボン化合物を抽出し、カラムクロマトグラフィー等の精製で高純度のイソフラボン化合物を得ることもできる。こうして得られたものは医薬品素材として使用することもできる。

【0012】

【実施例】以下、実施例を挙げて本発明を具体的に説明するが、これにより限定されるものではない。

【0013】実施例1

大豆胚軸1Kgをオープンロースターで150℃、30分間加熱処理を行い、冷却後100gずつ6ケに分け、恒温器で45℃で予備加熱後、表1に示す実験N0.1から6までの1つの各種粗酵素2gを50gの水に分散させ、大豆胚軸に混合しながら添加し、更にpH7に調整した。次に密閉容器に入れ、恒温器で45℃、6時間反応させた。各配糖体、各アグリコンの定量結果は表2に示した。比較例1は実施例1で酵素を加えない以外は、同じ方法で行った。

【0014】

【表1】使用した酵素標品の種類

実験N0.1はプロテアーゼM（天野製薬社製）アスペルギルス・オリゼ由来

実験N0.2はピオザイムA（天野製薬社製）アスペルギルス由来

実験N0.3はリパーゼA（天野製薬社製）アスペルギルス・ニガー由来

実験N0.4はセルラーゼA（天野製薬社製）アスペルギルス・ニガー由来

実験N0.5はアスペルギルス・オリゼIFO4075株の粗酵素標品

実験N0.6はアスペルギルス・ニガーIFO4043株の粗酵素標品

比較例1は無添加

【0015】培養による粗酵素の調製1（実験N0.5に

用いるために)。

アスペルギルス・オリゼIFO4075株を入手し、ポテトシュクロース寒天培地にて種培養を行い種培地とした。次に、粉末状の大豆胚軸1%、コーンスターチ1%、麦芽エキス0.02%、酵母エキス0.02%、リン酸2ナトリウム塩0.17%、リン酸1カリウム塩2.7%を含む液体培地を50mlずつ、20本の500ml容量の三角フラスコに分注しオートクレーブにて殺菌後冷却し、種培地より孢子を白金耳ずつ掻き取り植菌した。この培地を培養振盪機にて30℃、120ストローク/分の間振盪させ5日間培養した。培養後、培養液を集め遠心処理にて菌を除き、培養上清液を限外ろ過膜(アドバンテック社製UF膜分画分子量20,000)で濃縮・脱塩を行った。得られた濃縮液を凍結乾燥機にて乾燥させ約6gの粗酵素標品を得た。これを用い\*

\*て試験を行った。

【0016】培養による粗酵素の調製2(実験N0.6に用いるために)。

同様にアスペルギルス・ニガーIFO4043株を培養し粗酵素標品約5gを得た。

【0017】イソフラボンの分析方法

大豆胚軸1gをメタノールで還流抽出し、0.45μmのフィルター(ミリポア製)でろ過後、液クロにて、J. Agric. Food Chem. 41, 1961~1967, 1993記載の方法に従い分析し、イソフラボン含量を定量した。表1に示す各イソフラボンアグリコン、イソフラボン配糖体の含有量は、大豆胚軸1g中に含まれる量(mg/g)で示している。

【0018】

【表2】

実施例 1 の実験 N0. 1	2	3	4	5	6	比較例 1	
配糖体 (m g / g)							
ダイジン	7.0	5.4	6.6	6.8	3.2	4.0	8.1
ゲニスチン	0.8	1.0	1.3	1.3	0.9	0.9	1.5
アグリコン (m g / g)							
ダイゼイン	1.3	0.6	1.3	1.0	5.0	4.0	0.1
ゲニステイン	0.2	0.2	0.3	0.2	0.6	0.6	0.1

比較例1では、アグリコン化イソフラボンは殆ど生成されないのに対し、粗酵素を加えた実験N0.1~6ではイソフラボン配糖体からダイゼインを中心としたアグリコン化イソフラボンの生成量が増加していることを示している。

【0019】実施例2

大豆胚軸1Kgをオーブントースターで150℃、30分間の加熱処理後、冷却し、ミルで破碎を行い、30メッシュで篩別して粉末状大豆胚軸を得た。一方、アスペルギルス・オリゼIFO4075株を用いて前記の「調製1」記載の培地100mlずつ、3本の500ml容量の三角フラスコに分注しオートクレーブにて滅菌後冷却し、「調製1」同様に種培地より孢子を植菌し、※

※培養振盪機にて、30℃、120ストローク/分で振盪させて1日間培養し、これを種培養とした。次に、「調製1」記載の培地15Lを30L容量の発酵槽に分注し、蒸気滅菌後冷却し、種培養を植菌し、培養温度30℃、通気量1VVM、攪拌数200r.p.m.の条件にて培養を5日間行い、除菌後、限外ろ過膜にて濃縮・脱塩後、凍結乾燥し、粗酵素70gを得た。次に、この粗酵素を上記の粉末状大豆胚軸に加え、表3に示す様に酵素量、反応時間を変えた以外は実施例1同様に反応させた。

【0020】

【表3】

実施例 2 の実験 N0. 7	8	9	1 0	1 1	1 2	1 3
粗酵素添加量 (g) 2	2	2	5	5	10	10
反応時間( 時間) 6	12	24	6	12	6	12
配糖体 (m g / g)						
ダイジン 2.0	1.0	0.6	0.8	0.2	0.5	0.1
ゲニスチン 0.8	0.5	0.2	0.4	0.1	0.3	0.1
アグリコン (m g / g)						
ダイゼイン 6.1	6.9	7.2	7.3	7.4	7.5	7.6
ゲニステイン 0.8	1.0	1.1	1.2	1.3	1.2	1.3

7

実施例1よりもアグリコン化イソフラボンの生成量が更に増加していることを示している。

【0021】実施例1でアスペルギルス属由来の粗酵素を使用し、大豆胚軸のイソフラボン配糖体を容易にアグリコン化が出来た。更に、実施例2で反応条件を検討することでアグリコン化イソフラボンを多く含む大豆胚軸を得ることが出来た。

【0022】

【発明の効果】本発明は、大豆胚軸に微生物由来の酵素

8

を加え反応させることでイソフラボン化合物の配糖体を分解し、アグリコン化したイソフラボン化合物を生成させることにより生理作用の優れたアグリコン化したイソフラボン化合物を多く含む、飲食品、飼料、医薬品の用途に利用することができる素材を得るものである。以上のように、本発明は生理作用の優れたイソフラボン化合物のアグリコンを多く含む大豆胚軸を得るための製造法である。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**